

N^o D'ORDRE
135

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

TCHANG Joué Léon

Licencié ès Sciences

1^e THÈSE. — LA NATURE ET LA SYNTHÈSE BIOCHIMIQUES DES
PIGMENTS CAROTÉNOIDES CONTENUS DANS LES LEVURES
ROUGES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le Juin 1938, devant la Commission d'Examen

MM. CARDOT, *Président.*
DOUIN, *Examineur.*
FROMAGEOT —

LYON
BOSC Frères M. & L. RIOU
IMPRIMEURS-ÉDITEURS
42, Quai Gailleton, 42

1938

La nature et la synthèse biochimique
des pigments caroténoïdes
contenus dans les levures rouges

UNIVERSITÉ DE LYON - FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen

M. LONGCHAMBON, *, ☞, ☞ I, ☞.

Assesseur

M. VANEY, *, ☞ I, ☞.

Professeurs honoraires

MM. VESSIOT, C. *, ☞ I.
RIGOLLOT, *, ☞ I.
COUTURIER, *, ☞ I, ☞.

Professeurs

MM. DULAC, *, ☞ I., *Calcul différentiel et intégral*.
N ..., *Botanique*.
MEUNIER, O. *, ☞ I., *Chimie industrielle*.
SIRE, *, ☞ I, ☞, *Mécanique rationnelle et appliquée*.
VANEY, *, ☞ I, ☞, *Zoologie*.
CARDOT, *, ☞ I., *Physiologie générale*.
ROMAN, *, ☞ I., *Géologie*.
LOCQUIN, *, ☞ I., *Chimie générale*.
LONGCHAMBON, *, ☞, ☞, ☞ A., *Minéralogie*.
DOUIN, *, ☞, ☞ I., *Botanique*.
DÉJARDIN, *, ☞ I., *Physique générale*.
SOLLAUD, ☞ I., *Zoologie*.
THIBAUD, ☞ A., *Physique expérimentale*.
LEMARCHANDS, ☞ I., *Chimie appliquée*.
EYRAUD, ☞ I., *Mathématiques*.
FROMAGEOT, ☞ A., *Chimie biologique*.
AUMÉRAS, ☞ A., *Chimie physique*.



Maîtres de conférences

MM. DŒUVRE, ☞ I., *Chimie organique*.
PRETTRE, *Chimie minérale*.

Maître de conférences adjoint

M. BONNET, *, ☞ I., *Zoologie générale et agricole*.

Chargés de cours complémentaires

M^{re} BACHRACH, ☞ I., *Physiologie*.
MM. DUFAY, *Astronomie et Physique supérieure*.
VIRET, ☞ I., *Etude des roches*.
RANSON, *Géométrie supérieure*.
MAYET, *, ☞ I, ☞, *Anthropologie*.
PELOSSE, ☞ I., *Sériciculture*.
DARESTE DE LA CHAVANNE, ☞ I., *Géographie physique*.
SEYEWETZ, *, ☞ I., *Matières colorantes artificielles*.

Secrétaire

M. ROUX, ☞ A.

La nature et la synthèse biochimique des pigments caroténoïdes contenus dans les levures rouges

INTRODUCTION

La répartition des différents pigments caroténoïdes chez les différents organismes, leur isolement et l'étude de leurs propriétés chimiques et physiques, l'étude de leurs propriétés physiologiques, et plus spécialement celles concernant leurs relations avec la vitamine A, ont fait l'objet d'un nombre considérable de travaux : on en trouvera un excellent exposé dans les monographies de Lederer [1, 2] et de Zechmeister [3]. En revanche la synthèse biologique de ces pigments semble n'avoir fait jusqu'ici l'objet que d'un petit nombre de recherches. Ceci s'explique par les difficultés très grandes que rencontrent de telles investigations. Or il semble que ce soit chez les micro-organismes, bactéries et levures, que le mécanisme de la synthèse des caroténoïdes puisse être le plus facilement élucidé ; mais, si la présence de caroténoïdes chez un certain nombre de bactéries est un fait démontré depuis longtemps [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10], l'étude des conditions de synthèse de ces pigments par

quelques bactéries n'a été abordé que récemment [11, 12].

En ce qui concerne les levures, on sait que les espèces appartenant au genre *Rhodotorula* (levures rouges), renferment des pigments caroténoïdes. L'étude de ces pigments a été faite pour la première fois par Zopf [5], qui a constaté, en 1889, la présence de caroténoïdes dans les cellules de *Torula Rubra* ; beaucoup plus tard, en 1916, Chapman [13], reprenant l'étude du pigment de *Torula Rubra*, a essayé, sans succès, de le purifier, mais a trouvé que le spectre d'absorption de la matière colorante extraite différait de celle du carotène connu à l'époque. C'est Lederer [14] qui, le premier et le seul, semble-t-il, a appliqué au mélange de pigments contenus dans *Torula Rubra*, les techniques modernes de séparation par la méthode de partage et par la méthode d'adsorption chromatographique mise au point ces dernières années par R. Kuhn et ses collaborateurs. Lederer a ainsi réussi à extraire de la matière colorante d'une *Torula* rouge, quatre pigments caroténoïdes différents, dont trois présentent les caractères de solubilité des hydrocarbures, et le quatrième la solubilité d'un acide. Des trois caroténoïdes à caractères d'hydrocarbures, l'un s'est révélé être le β carotène, l'autre est un nouveau caroténoïde auquel Lederer a donné le nom de Torulène, le troisième, qui s'est montré peu stable, n'a pu être purifié. Quant au caroténoïde à caractère acide, soluble dans l'alcool potassique, Lederer lui a trouvé des caractères communs à l'astacine [4, 5, 4', 5', tétracéto- β carotène] [15], qui cons-

titue, sous forme de combinaisons diverses, les pigments des crustacés [16].

Il était intéressant d'étudier les conditions requises pour que les levures rouges soient capables de faire la synthèse des différents pigments caroténoïdes, auxquels est due leur coloration. Mais auparavant il m'a paru nécessaire de reprendre l'étude de ces pigments, de les extraire et de pousser leur séparation aussi loin que possible pour tâcher de déterminer leur nature et, si possible, de mesurer dans quelles proportions chacun d'eux est présent dans les cellules. En fait, les levures rouges se sont montrées être un matériel biologique favorable pour l'extraction des pigments en question, ainsi que pour l'étude de leur synthèse biologique. En ce qui concerne cette synthèse, on doit remarquer qu'il ne s'agit ici nullement de la synthèse de pigments en dehors de la cellule, mais bien dans la cellule elle-même. Une recherche sur la synthèse de ces pigments nécessite donc, comme condition préalable, que la proportion des pigments cellulaires puisse varier dans de larges proportions à l'intérieur de la cellule sans que celle-ci cesse de se développer, c'est-à-dire de réaliser d'autres synthèses. Autrement dit le pigment ne doit pas faire partie de constituants cellulaires dont la proportion doit être constante. L'expérience montre, comme on le verra plus loin, que l'on peut précisément faire varier la teneur des caroténoïdes chez les levures étudiées ici dans de grandes limites allant de 0 à une teneur maxima sans que les cellules cessent de se développer.

Le présent travail comporte ainsi deux parties prin-

ciales : une première partie, consacrée à l'étude des différents pigments caroténoïdes contenus dans les cellules et comprenant elle-même deux chapitres, dont le premier traite de l'extraction des pigments de la cellule, de leur séparation et de leur identification, et le second expose les propriétés physiologiques de ces mêmes pigments. Une deuxième partie consacrée à l'étude des conditions dans lesquelles il faut placer les organismes pour pouvoir réaliser à volonté la synthèse de leurs matières colorantes, et comprenant elle aussi deux chapitres, exposant respectivement les recherches qualitatives et les recherches quantitatives poursuivies sur ce sujet.

Il a été exécuté au cours de ces trois dernières années, au laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences de Lyon, sous la direction de M. le Professeur Fromageot, auquel je suis heureux d'exprimer ici toute ma gratitude.

CHAPITRE PREMIER

ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES DIFFERENTS PIGMENTS CAROTENOIDES CONTENUS DANS RHODOTORULA SANNIEI

La caractérisation de la nature des différents pigments appartenant à la classe des caroténoïdes exige la séparation de chacun d'eux à l'état aussi pur que possible. Cette séparation ne peut se faire que si l'on dispose de quantités suffisantes de pigments, c'est-à-dire finalement, d'organismes qui les renferment. Le présent chapitre comprendra donc tout d'abord la description du mode d'obtention des levures rouges en quantités suffisantes, puis celle des techniques d'isolement des différents pigments à partir des organismes obtenus en relativement grosses masses, puis enfin une étude des caractères de ces pigments, étude permettant leur détermination éventuelle.

1° OBTENTION DES LEVURES

A. — ORGANISMES UTILISÉS

La levure rouge utilisée dans les recherches actuelles provient du laboratoire de bactériologie in-

dustrielle de l'Institut de Chimie de Lyon où elle a été isolée à partir de confiture ; elle nous a été donnée par M. Chambard, que nous sommes heureux de remercier ici. D'après l'étude qu'en a bien voulu faire le « Centraalbureau voor Schimmelcultures », à Baarn, auquel nous exprimons également tous nos remerciements, cet organisme appartient à une espèce très voisine de *Rhodotorula Sanniei*, sans lui être toutefois identique. Nous la considérerons ici comme une variété de *Rhodotorula Sanniei*, et c'est sous ce nom que nous la désignerons. Ses différents caractères et notamment son aptitude à croître dans différents milieux seront indiqués plus loin, à propos de l'étude des conditions requises pour la synthèse des pigments. Quant aux autres caractères de *Rhodotorula Sanniei*, on en trouve la description détaillée dans la monographie de J. Lodder [17].

B. — OBTENTION EN GROSSES MASSES

Les organismes utilisés proviennent de cultures conservées, dans des tubes à essais, sur de l'eau de touraillons gélosée, additionnée de 10 % de saccharose. Le milieu destiné à la production des levures en grand est constitué également par de l'eau de touraillons additionnée de 10 % de saccharose et de 2 % d'agar. Ce milieu est réparti dans des flacons de Roux de 1 litre, à raison de 200 cc. par flacon ; toutes ces manipulations, ainsi que les stérilisations nécessaires, sont exécutées avec les précautions habituelles.

L'ensemencement se fait en mettant les levures en suspension, par addition d'eau distillée stérile dans les tubes à essais contenant les cultures mères, et en introduisant 2 cc. de cette suspension dans chacun des flacons de Roux à ensemer. Ces flacons sont ensuite maintenus à la température ordinaire (18 à 20°). sans prendre de précautions spéciales contre la lumière ; la récolte des organismes, qui a lieu après 4 à 5 semaines, est effectuée de la façon suivante :

On recueille tout d'abord la totalité des levures par un premier lavage du gel d'agar avec un peu d'eau distillée. Puis les organismes étant rassemblés dans un tube de centrifugeuse, on leur fait subir une série de lavages (trois ou quatre) par centrifugations successives, jusqu'à ce que l'eau surnageante soit bien incolore.

Dans ces conditions, un flacon de Roux permet de récolter environ 1 gr. de levures (poids séché à 110°). Chaque opération portant sur 20 à 30 flacons de Roux, donne ainsi une quantité de levure de l'ordre de 20 à 30 gr. (poids sec).

Les levures ainsi recueillies sont séchées par agitation énergique en présence d'acétone anhydre, traitement qui dissout une petite partie des pigments contenus dans les cellules ; cette fraction des pigments sera récupérée ultérieurement. Après traitement par l'acétone, les levures sont séchées dans un dessiccateur sous vide. Elles sont alors prêtes à l'extraction proprement dite des pigments.

2° ISOLEMENT DES DIFFERENTS PIGMENTS

Cet isolement est basé sur l'utilisation, d'une part de la méthode de partage entre différents solvants, et d'autre part de la méthode d'adsorption chromatographique. Dans l'ensemble ces méthodes sont les mêmes que celles de R. Kuhn et Brokmann [18].

Toutes les manipulations décrites ci-dessous, depuis le broyage des cellules jusqu'à la préparation des solutions destinées aux observations spectroscopiques, se font en atmosphère d'azote ; ce gaz, avant son emploi, est débarrassé de la petite quantité d'oxygène qu'il contient toujours, par passage sur du cuivre métallique chauffé au rouge sombre.

A. — SÉPARATION EN DEUX GROUPES (PIGMENTS NEUTRES ET PIGMENT ACIDE), PAR LA MÉTHODE DE PARTAGE

Dans une première série d'expériences préliminaires, deux à trois grammes de levures, préalablement séchées à l'acétone, comme il vient d'être dit, sont tout d'abord broyées dans un mortier avec du benzène contenant un peu de méthanol (environ 10 %) ; ce broyage est répété jusqu'à ce que les cellules deviennent tout à fait blanches. On réunit alors les liquides d'extraction, puis on leur ajoute une quantité de méthanol telle que le volume de cet alcool soit maintenant égal au volume du benzène. On place la totalité des solvants dans une éprouvette à

décantation graduée, et on introduit une quantité d'eau égale à 10 % de la quantité de méthanol ; cette addition d'eau provoque la séparation des solvants en deux couches : une couche benzénique, fortement colorée en rouge violacé, qui surnage, et une couche de méthanol aqueux, légèrement coloré en rouge orangé, qui se trouve à la partie inférieure. On élimine la couche benzénique, puis on lave la solution hydroalcoolique avec un peu de benzène ; on constate alors que la totalité du pigment dissous dans la couche hydroalcoolique passe dans le benzène, ce qui montre que l'on n'a ici aucun pigment appartenant au groupe des xanthophylles libres (non estérifiées).

Les différentes fractions de benzène sont alors réunies et traitées par un volume égal de potasse alcoolique (5 gr. de KOH dans 100 cc. d'alcool absolu), pendant 3 heures à 40°. Ce traitement a pour but de saponifier les pigments qui pourraient exister sous forme d'éthers.

Après ce traitement, on ajoute à la solution benzène-alcool potassique une quantité d'eau égale à 20 % de la quantité d'alcool. Le mélange se sépare à nouveau en deux couches : une couche benzénique supérieure, colorée en rouge orangé, et une couche hydroalcoolique inférieure, colorée en jaune orangé ; cette coloration de la solution hydroalcoolique alcaline indique maintenant la présence de pigments acides. La couche benzénique est lavée avec un peu de méthanol, puis additionnée d'un peu d'eau, ce qui permet de séparer le benzène de l'alcool méthylique aqueux ; ce dernier solvant reste pratiquement

incolore, ce qui indique l'absence de xanthophylles estérifiées dans les pigments initiaux. Les pigments de *Rhodotorula Sanniei* ne contiennent ainsi aucune xanthophylle, soit à l'état libre, soit à l'état d'esters. L'ensemble des traitements précédents a abouti à répartir ainsi la totalité des pigments : d'une part en solution benzénique, et d'autre part en solution hydroalcoolique alcaline.

Mais l'emploi du benzène comme solvant ne permet pas d'utiliser de façon convenable les méthodes d'adsorption sélectives pour séparer les différents pigments; cette séparation se fait beaucoup mieux si les pigments, au lieu d'être dissous dans le benzène, sont dissous dans l'éther de pétrole (point d'ébullition 30-50°) (Lederer [1]). D'autre part, l'absence de xanthophylles permet de simplifier les observations : le traitement est alors le suivant : 20 gr. de levures séchées à l'acétone sont broyées en présence d'éther de pétrole (toujours en atmosphère d'azote) ; la solution des pigments dans l'éther de pétrole est soumise, comme précédemment, à une saponification qui se fait ici à la température ordinaire, pendant 14 heures. On obtient ainsi, d'une part les pigments neutres en solution dans l'éther de pétrole (solution jaune orangé) et d'autre part le ou les pigments à caractère acide en solution hydroalcoolique potassique (solution rouge violacée).

Quant à la fraction de pigments dissoute dans l'acétone au moment du traitement des levures vivantes par ce solvant, sa récupération est faite en ajoutant à la solution acétonique une quantité convenable

d'éther de pétrole, puis une certaine quantité d'eau : l'éther de pétrole enlève alors quantitativement à la solution acétonique la petite quantité de pigments que cette dernière renfermait ; cette dernière fraction de solution de pigments dans l'éther de pétrole est réunie à la fraction principale.

B. — ISOLEMENT DES DIFFÉRENTS PIGMENTS PAR ADSORPTION SÉLECTIVE

Les opérations précédentes permettent ainsi d'extraire les pigments des cellules et de les répartir en deux catégories : pigments neutres en solution dans l'éther de pétrole, pigments acides en solution dans l'alcool potassique aqueux. Pour isoler chacun des pigments contenus dans chacune de ces solutions, on utilise la méthode d'adsorption chromatographique (*) dont le principe a été donné dès 1906 par Tswett [19] et qui a été appliquée avec le succès que l'on sait à la séparation d'une série de substances, notamment à celles des différents caroténoïdes, par R. Kuhn et ses collaborateurs.

L'appareil d'adsorption chromatographique employé est analogue à celui décrit par Zechmeister [3, 21]. Il se compose d'un tube cylindrique en verre Pyrex, dont les dimensions sont ici de 34 cm. de hauteur sur 1,5 cm. de diamètre intérieur, et qui constitue le tube d'adsorption proprement dit. Ce tube est réuni,

(*) On trouvera des données précieuses sur les applications de la méthode d'adsorption chromatographique dans l'excellent ouvrage de ZECHMEISTER et CHOLNOKY (21).

par un rodage, à un filtre de laine de verre ; ce filtre débouche lui-même dans une fiole à filtration sous vide. Le tube d'adsorption contient un mélange d'une partie d'oxyde d'aluminium fibreux d'après Wislicenus et de quatre parties d'oxyde d'aluminium anhydre purissime Merck. Le remplissage du tube par ce mélange d'oxydes d'aluminium doit être fait avec un soin particulier pour que le tassement de la matière pulvérulente soit bien homogène. Un tampon de laine de verre, placé à la partie supérieure de la colonne adsorbante, en assure suffisamment la fixité.

a) *Traitement de la solution éthérée.*

Isolement du β -carotène.

La solution éthérée obtenue au cours des opérations précédentes (500 à 600 cc.) est concentrée sous vide jusqu'à un volume d'environ 200 cc., puis est lentement versée, avec précautions, à la partie supérieure du tube à adsorption chromatographique, en même temps que, dans l'appareil relié à une trompe à eau, règne une légère dépression facilitant le passage du liquide à travers la colonne adsorbante. Au fur et à mesure que la solution passe à travers cette colonne, il se forme plusieurs zones ou anneaux colorés, nettement séparés les uns des autres : à la partie supérieure apparaît tout d'abord un anneau brun (A), au-dessous duquel se trouvent trois anneaux très fins, voisins les uns des autres (B_1 , B_2 , B_3) ; viennent ensuite deux zones assez larges, et dont la séparation est tout d'abord assez confuse (C et D) ; ces deux

zones descendent lentement au cours du passage de la solution ; d'autre part, une partie des pigments passe à travers la colonne adsorbante sans être retenue, et colore le filtrat en jaune. On arrête le passage de la solution lorsque les zones C et D sont descendues à un niveau qui n'est plus que le tiers de la hauteur de la colonne adsorbante. On recueille alors le filtrat coloré en jaune que l'on met à part (fraction E) ; on verse ensuite à la partie supérieure de la colonne de l'éther de pétrole pur ; les zones C et D continuent leur progression vers le bas, tout en se séparant nettement. La zone supérieure (C), représentant une quantité relativement forte de pigments, est colorée en violet ; la zone inférieure (D), correspondant à une quantité moins grande que la précédente apparaît comme colorée en brun orangé.

Ce passage d'éther de pétrole pur déplace la solution initiale demeurée dans les espaces interstitiels des grains d'oxyde d'aluminium ; on recueille donc pendant quelque temps dans la fiole à vide un filtrat coloré en jaune (E). On cesse le passage d'éther de pétrole pur lorsque le liquide, apparaissant à la partie inférieure de la colonne d'adsorption, devient incolore.

L'ensemble de ces opérations permet ainsi de séparer les pigments en deux groupes : pigments retenus par la colonne adsorbante et pigment non retenu, restant en solution dans l'éther de pétrole.

Identification du β -carotène. — La solution dans l'éther de pétrole du pigment correspondant à la fraction E, pigment non retenu par la couche adsorbante,

est évaporée à sec sous vide ; on obtient ainsi un résidu orangé, que l'on dissout dans le sulfure de carbone, ce qui donne une solution rouge orangée ; observée au spectroscope, cette solution présente trois bandes d'absorption très nettes à 454, 481 et 520 m μ . La position de ces bandes d'absorption, jointe aux caractères de solubilité de la substance et à ses propriétés physiologiques, dont on verra la description plus loin, permet de la caractériser comme étant du β -carotène.

b) Séparation et identification des pigments correspondant aux zones A, B, C, D.

Les pigments correspondant aux zones A, B, C, D, restées dans la colonne d'adsorption, sont alors séparés mécaniquement. L'on isole ainsi la fraction A, le groupe B (B₁, B₂, B₃) (qu'il n'est pas possible de séparer davantage par cette méthode), les fractions C et D.

a) Traitement de la fraction C. — Isolement du torulène.

La portion d'oxyde d'aluminium sur laquelle est fixée la fraction C est traitée par l'éther de pétrole additionné de 1 % de méthanol ; le pigment repasse en solution ; on élimine les oxydes d'aluminium, puis à la solution limpide, on ajoute une quantité d'eau suffisante pour provoquer sa séparation en deux couches, ce qui permet d'éliminer le méthanol ; le pigment correspondant à la fraction C passe en solution

dans l'éther de pétrole ; on le purifie en faisant passer une deuxième fois cette solution sur une nouvelle colonne adsorbante constituée par les oxydes d'aluminium ; il se forme de nouveau une zone orangée au-dessous de la zone rouge-violette correspondant à la fraction C proprement dite. Cette zone orangée correspond à la fraction D, qui n'avait pu être complètement éliminée à la première opération. On sépare mécaniquement C de D ; on opère l'élution de C au moyen d'éther de pétrole additionné de méthanol ; puis on élimine le méthanol comme il a été dit précédemment.

Pour caractériser le pigment correspondant à la fraction C, on évapore à sec, sous vide, une portion de la solution d'éther de pétrole ; une partie du résidu est reprise par le sulfure de carbone, ce qui donne une solution violette présentant trois bandes d'absorption très nettes à 495, 523 et 562 $m\mu$; une autre partie, dissoute dans l'hexane, constitue une solution présentant trois bandes d'absorption à 455, 484 et 520 $m\mu$. Les caractères de solubilité du pigment et la position des bandes d'absorption des solutions de sulfure de carbone et d'hexane, montrent qu'il s'agit ici d'un pigment identique au torulène isolé pour la première fois par Lederer. Il était intéressant d'avoir un spectre quantitatif de la substance ; pour ce faire, on évapore la totalité de la solution dans l'éther de pétrole, avec les précautions habituelles ; le résidu rouge orangé est dissous dans une petite quantité de benzène, et la solution obtenue est additionnée d'un peu de méthanol ; on concentre

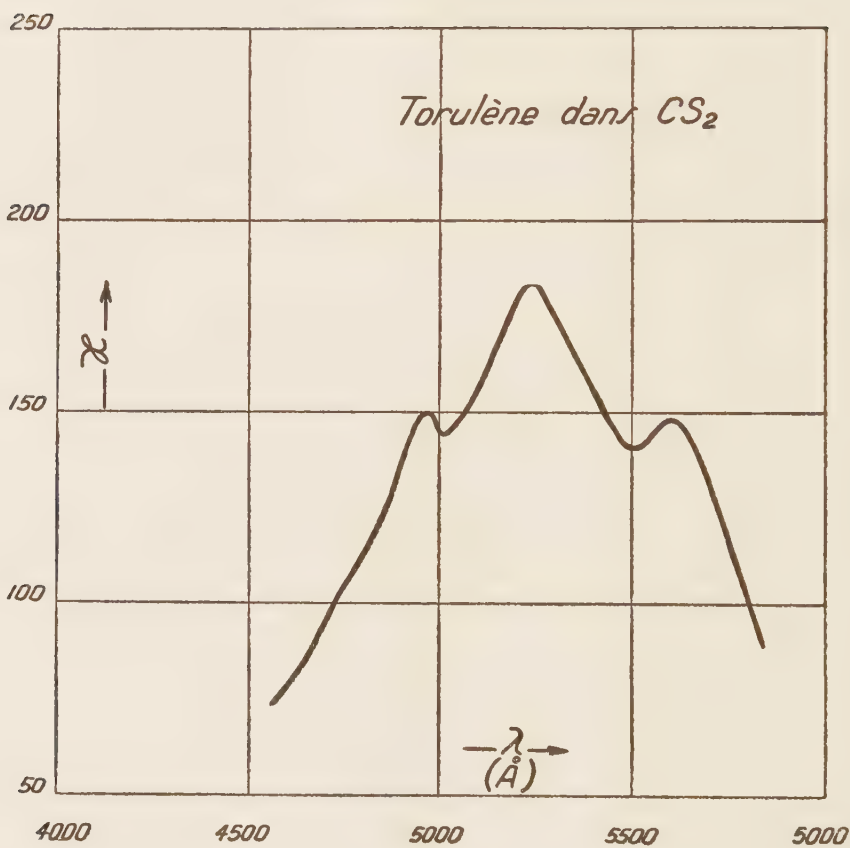


FIG. 1

sous vide jusqu'à l'apparition d'un trouble dans la solution ; après abandon pendant une nuit, à la température ordinaire, les cristaux rouges-violetés à reflets métalliques caractéristiques du torulène se précipitent ; observés au microscope, ils apparaissent bien homogènes.

Ces cristaux, séchés sous vide et pesés à la microbalance, représentent un poids de 0,717 mg. On les dissout quantitativement dans un volume donné de sulfure de carbone ; on peut ainsi établir quantitativement la courbe d'absorption du torulène. Cette courbe résulte de mesures faites selon la technique habituelle, à l'aide du spectrophotomètre de Jobin et Yvon ; elle est donnée par la figure 1.

β) *Traitement de la fraction D. Isolement du γ -carotène.*

La portion d'oxydes d'aluminium sur laquelle est fixé le pigment correspondant à la fraction D est traitée par de l'éther de pétrole additionné de méthanol. Le pigment mis ainsi en solution est purifié par un traitement identique à celui qui a été précédemment utilisé pour le torulène.

Dissous dans l'éther de pétrole, le pigment correspondant à la fraction D permet d'observer deux bandes d'absorption à 462 et 495 m μ ; sa solution dans le sulfure de carbone présente trois bandes, à 462, 495 et 531 m μ ; ses cristaux obtenus à partir du mélange benzène-méthanol sont rouges et tout à fait semblables aux cristaux de γ -carotène représentés

dans le travail de Kuhn et Brockmann [20]. L'ensemble de ces propriétés montre que le pigment en question est du γ -carotène. La très faible quantité de ce pigment n'a pas permis de vérifier ses propriétés de provitamine A.

γ) Traitement de la fraction A. Isolement du lycopène.

La portion d'oxydes d'aluminium sur laquelle est fixé le pigment correspondant à la fraction A est traitée par de l'éther de pétrole additionné de 1 % de méthanol. On obtient ainsi une solution qui présente deux bandes d'absorption à 474 et 505 m μ . Par évaporation, cette solution laisse un résidu qui, repris par le sulfure de carbone, donne une nouvelle solution, présentant trois bandes d'absorption à 480, 506 et 476 m μ . La position de ces bandes d'absorption et le comportement du pigment vis-à-vis des adsorbants et des différents solvants, permet de caractériser ce pigment comme étant du lycopène.

δ) Fraction B_1 , B_2 , B_3 .

Les pigments correspondant aux zone B_1 , B_2 , B_3 n'ont pu être obtenus en quantités suffisantes pour permettre une tentative d'isolement ou de caractérisation ; ils ne forment en effet sur la colonne adsorbante que des anneaux très minces, dont la netteté et l'écartement suffit à manifester la présence, sans que l'on puisse tirer la moindre conclusion sur leur nature.

c) *Extraction des pigments contenus dans la solution hydroalcoolique alcaline.*

Lorsque l'on ajoute de l'éther de pétrole à la solution hydroalcoolique alcaline du pigment à caractère acide, ce pigment ne passe que lentement et incomplètement dans l'éther de pétrole, mais ce passage se fait plus facilement si l'on introduit ensuite un assez grand volume d'eau ; il se fait rapidement et complètement si, au lieu d'eau, l'on introduit de l'acide acétique dilué. On obtient alors une solution du pigment dans l'éther de pétrole, rouge, surnageant la solution aqueuse incolore ; on élimine cette dernière, puis on fait passer la solution dans l'éther de pétrole sur la colonne adsorbante d'oxyde d'aluminium ; il se forme un seul anneau coloré, tout à fait au début de la colonne, ce qui indique qu'il ne s'agit vraisemblablement ici que d'un pigment unique ; il est impossible d'entraîner cet anneau coloré, soit par l'éther de pétrole, soit par de l'éther de pétrole additionné de méthanol (1 à 10 %) ou d'éthanol (1 %) soit par du benzène. Son élution se fait, en revanche, facilement par une solution alcoolique de potasse (5 %), ce qui permet d'obtenir en solution ce pigment à caractère acide, ainsi purifié. On fait passer le pigment en solution dans l'éther de pétrole comme il a été dit précédemment ; par évaporation sous vide, cette solution abandonne un résidu huileux violet qui, dissous dans du sulfure de carbone, donne une solution présentant trois bandes d'absorption dont les limites sont assez confuses, et qui pourraient être considérées comme une seule bande très large ;

néanmoins, on peut reconnaître deux légers maxima à 498 et 570 $m\mu$, avec un maximum intense à 535 $m\mu$. Il n'a pas été possible d'obtenir le pigment en question sous forme cristallisée, quels que soient les solvants employés dans ce but : pyridine-eau, pipéridine-eau, benzène-méthanol, éthanol-eau. Il m'a paru utile d'établir quantitativement la courbe d'absorption de cette substance : l'évaporation de la solution du pigment dans l'éther de pétrole a donné un résidu pesant 281,3 mg., qui, dissous dans 10 cc. de sulfure de carbone, donne une solution dont on prélève 1 cc. que l'on amène à 5 cc. par addition de CS_2 . C'est sur cette dernière solution que sont effectuées les mesures d'absorption. Ces mesures, faites à l'aide du spectrophotomètre de Jobin et Yvon, permettent de tracer la courbe de la figure 2.

Il est à remarquer que, vraisemblablement, le pigment à caractère acide dont il est question ici doit être le même que celui que Lederer a déjà signalé dans *Torula Rubra* ; néanmoins, les spectres d'absorption observés par cet auteur et par nous-même sont légèrement différents : Lederer signale en effet que le pigment acide qu'il a isolé présente, lorsqu'il est en solution dans le sulfure de carbone, une large bande d'absorption comprise entre 535 et 600 $m\mu$. Le seul caractère de ce pigment acide qui permettrait de le rapprocher d'un pigment à structure connue, est la forme générale de son spectre d'absorption, analogue à celui de l'astacine ; néanmoins, ses autres propriétés : solubilité dans le sulfure de carbone et dans l'éther de pétrole, l'impossibilité de l'obtenir fa-

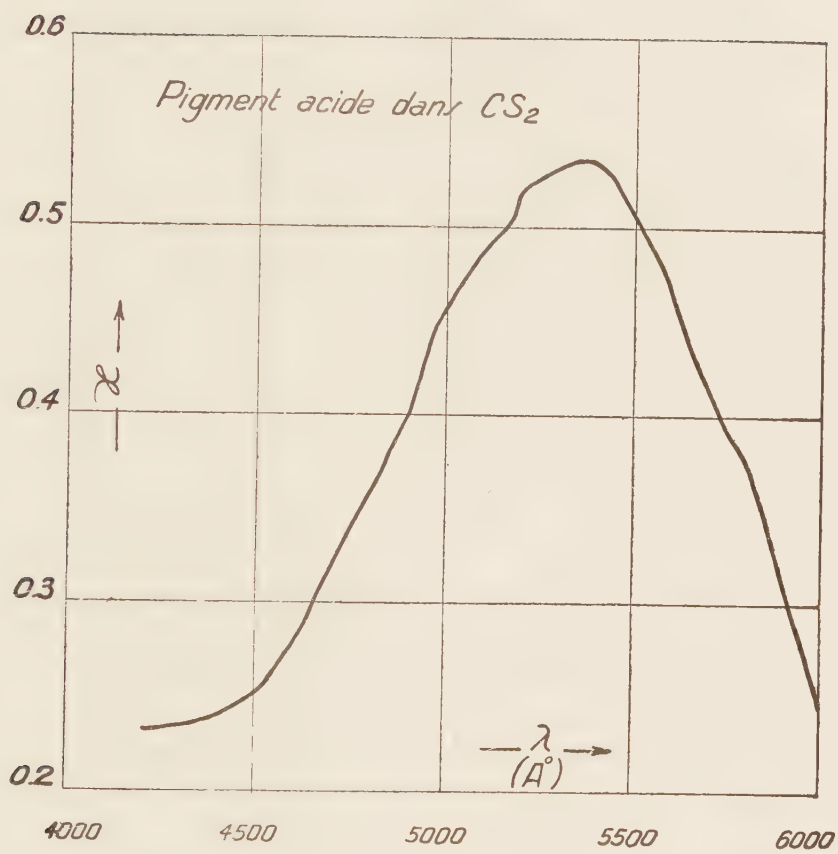


FIG. 2

cilement cristallisé, nous portent à penser qu'il s'agit plutôt ici d'un pigment différent de l'astacine.

Il apparaît ainsi qu'il existe dans les cellules de *Rhodotorula* huit pigments caroténoïdes différents : sept pigments neutres qui sont vraisemblablement des carbures d'hydrogène, et un pigment à caractère acide. De ces huit pigments, quatre seulement ont pu être identifiés et se sont montrés être respectivement du β -carotène, du γ -carotène, du torulène et du lycopène. Le tableau I indique les propriétés optiques des pigments ainsi identifiés, comparées à celles que l'on trouve dans la littérature [2].

Tableau I

IDENTIFICATION DES PIGMENTS NEUTRES

Pigments		Bandes d'absorption (en $m\mu$)					
		dans CS_2			dans éther de pétrole		
β -carotène	mesurées	454	481	520	—	455	485
	littérature	452	484	521	424	452	485
γ -carotène	mesurées	462	495	531	—	462	495
	littérature	463	496	533	431	462	495
torulène	mesurées	495	523	562			
	littérature	488	522	565			
lycopène	mesurées	475	505	542	—	474	504
	littérature	474	506	546	444	474	506

(*) Le pigment caractérisé ici comme étant du β -carotène pourrait être de la crypto-xanthine dont les propriétés physiques (solubilité dans l'éther de pétrole, bandes d'absorption en solution dans CS_2 se trouvant à 452, 483 et 519 $m\mu$) et dont les propriétés physiologiques (source de vitamine A) sont très voisines de celles

*Détermination quantitative des carotènes, du torulène
et du pigment acide dans les cellules
de Rhodotorula.*

Les recherches précédentes montrent que parmi les pigments caroténoïdes renfermés dans les cellules de *Rhodotorula*, les plus abondants, relativement, sont le β -carotène, le torulène et le pigment acide. Il était intéressant de mesurer la quantité de chacun de ces pigments dans un poids donné de levures. Ces mesures sont faites de la façon suivante :

Les levures utilisées sont cultivées dans les mêmes conditions que celles dont il a été question jusqu'ici, à cette différence près qu'au lieu d'être placées à la température ordinaire et d'être récoltées après 4 semaines, elles sont maintenues à 28° et récoltées après 2 semaines. Après leur récolte, elles sont déshydratées par l'acétone, puis broyées avec de l'éther de pétrole, toujours en atmosphère d'azote ; la solution obtenue est ensuite saponifiée ; puis les pigments neutres, en solution dans l'éther de pétrole, sont séparés par adsorption sélective, et le pigment acide est mis en solution dans l'éther de pétrole. Les solutions de chacun de ces pigments sont faites quantitativement dans des volumes déterminés de solvant.

On mesure l'absorption de chaque solution observée sous une épaisseur donnée, pour une longueur

du β -carotène. Il n'est pas possible, dans le cas actuel, de décider avec certitude en faveur de l'un ou de l'autre de ces pigments. Néanmoins, le comportement du mélange des pigments au cours de leur partage entre éther de pétrole et méthanol aqueux conduit à penser que l'on a probablement à faire au β -carotène.

d'onde donnée. Les longueurs d'onde choisies et les coefficients d'absorption correspondants sont donnés dans le tableau II, qui indique également la quantité en poids de chacun des pigments étudiés, par gramme de levure séchée à 110°.

Tableau II

PROPORTION DES DIFFÉRENTS PIGMENTS
DANS LES CELLULES DE RHODOTORULA

λ =longueur d'onde utilisée pour la mesure spectrophotométrique.

κ =coefficient d'absorption, donné par la formule:

$$\kappa = \frac{2,3}{c.d} \log. \frac{I_0}{I}$$

où c =concentration en grammes par litre (ou en mg. par cc.).

d =épaisseur de la cuve en cm.

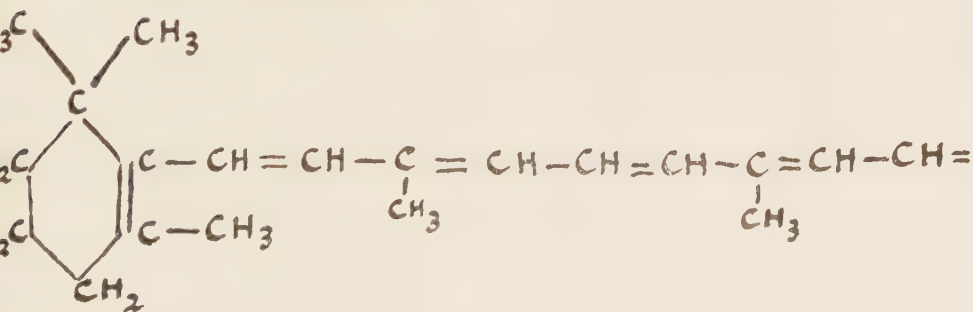
$\log. \frac{I_0}{I}$ est donné directement par le spectrophotomètre.

Pigments	λ (en $m\mu$)	κ	Poids en γ par gramme de levure sèche
β -carotène	483	560	10
torulène	523	184	143
pigment acide	535	0,53	29,000

CHAPITRE II

ETUDE DES PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES DES PIGMENTS DE RHODOTORULA

Les expériences du chapitre précédent ont permis d'isoler et de caractériser une série de pigments caroténoïdes contenus dans les cellules de *Rhodotorula Sanniei*. L'identification de ces pigments est basée essentiellement sur leur comportement vis-à-vis des adsorbants et sur leurs solubilités d'une part, et sur la position des bandes d'absorption de leurs solutions dans CS₂ et l'éther de pétrole d'autre part. Il était utile de compléter cette identification par l'étude de leur aptitude à se comporter en source de vitamine A. On sait en effet que cette aptitude correspond à la présence du groupement :



dans la molécule des pigments actifs à ce point de vue, groupement qui se transforme facilement, chez les organismes supérieurs, en vitamine A.

Parmi les nombreux caroténoïdes connus jusqu'ici, quatre d'entre eux peuvent être transformés en vitamine A par l'organisme des rats; ce sont les trois carotènes α , β et γ , et la cryptoxanthine, très voisine, par sa structure et ses propriétés physiques, du β -carotène. Les autres pigments caroténoïdes : lycopène, xanthophylles diverses (sauf la cryptoxanthine), etc., ne subissent pas cette transformation.

D'autre part, il était intéressant de voir si des pigments à structure non encore déterminée, comme le pigment acide et le torulène, étaient susceptibles d'agir, eux aussi, en pro-vitamine A, c'est-à-dire contiennent dans leurs molécules, le groupement actif.

TECHNIQUE

Les expériences sont réalisées de la façon suivante : les animaux utilisés sont de jeunes rats blancs, de 30 à 40 gr., et qui, pour chaque expérience, appartiennent à une même portée. Ces animaux, placés dans des conditions convenables, sont soumis au régime, carencé en vitamine A, établi par Simonnet [22] ; ce régime, équilibré et complet en ce qui concerne tous les facteurs de croissance nécessaires autres que la vitamine A, comprend (*) :

(*) Nous exprimons ici tous nos remerciements aux Etablissements Byla qui ont gracieusement mis à notre disposition les produits spéciaux nécessaires à la confection de ce régime, ainsi que l'amunine utilisée dans les essais témoins.

Peptone pancréatique du muscle « Byla »....	17 %
Levure de bière pour avitaminose A « Byla ».	3 %
Saccharose	64 %
Huile d'olive	12 %
Sels minéraux	4 %

Papier filtre.

Eau, à discrétion et fournie à part.

Remarques. — 1° L'huile d'olive est préalablement autoclavée, en couche mince, pendant quelques minutes à 120°, et ce, à deux reprises ; 2° les sels minéraux sont ceux du mélange d'Osborne et Mendel [23] ; ce mélange est obtenu comme il suit :

On prend les quantités indiquées des substances suivantes :

Substances	Grammes	Substances	Grammes
CO_3Ca	134,0	ac. citrique, H_2O	111,1
CO_3Mg	24,2	citrate de Fe, 1 1/2 H_2O	6,34
CO_3Na_2	24,2	KI	0,02
CO_3K_2	141,3	SO_4Mn	0,079
PO_4H_3	103,2	NaF	0,248
HCl	53,4	$(\text{SO}_4)_4\text{K}_2\text{Al}_2$	0,0245
SO_4H_2	9,2		

On mélange les acides, on y incorpore les carbonates et le citrate de Fe ; les quatre derniers produits sont ajoutés en solutions aqueuses à concentrations connues. Le mélange final est évaporé à sec à 100°, puis pulvérisé ; 3° l'ensemble des vitamines B nécessaires est apporté par la levure de bière ; rappelons ici que les rats n'ont pas besoin de vitamine C ;

4° le rôle d'aliment encombrant est joué par le papier filtre (cellulose).

Chaque série d'expériences comporte trois lots d'animaux : un premier lot est constitué par des animaux soumis au régime carencé tel qu'il vient d'être décrit ; un second lot renferme des animaux soumis à ce même régime, mais auxquels on administre en outre de l'amunine « Byla » comme source de vitamine A; enfin, dans un troisième lot, les animaux, toujours soumis au même régime carencé, reçoivent en outre les substances (pigments ou levures entières), dont on recherche l'activité comme sources de vitamine A. Ces substances, dissoutes ou mises en suspension dans l'huile d'olive, sont administrées sous forme de gouttes données quotidiennement à chaque animal, et non pas incorporées au régime, et l'on observe leur action soit préventive, soit curative des troubles provoqués par l'avitaminose A.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Une première série d'expériences est destinée à mettre en évidence les propriétés des cellules de levures rouges, entières, séchées à l'acétone, comme source de substances préventives ou curatives de l'avitaminose A. Ces expériences portent sur 6 rats dont les poids initiaux varient de 32 à 40 gr., et qui sont répartis et traités de la manière suivante :

Rats 1 (♀) et 2 (♂) : régime carencé. Le rat 1 est soumis à ce régime jusqu'à sa mort ; le rat 2 est soumis à ce régime jusqu'à l'apparition des symptômes

caractéristiques de la xérophtalmie (x) ; lorsque celle-ci est bien établie, l'animal reçoit (v) des levures entières à la dose journalière de 400 mg. de levure sèche, qui lui est administrée humectée par un peu d'huile d'olive autoclavée.

Rats 3 (♂) et 4 (♂) : régime carencé + 1 goutte d'amunine par jour.

Rats 5 (♀) et 6 (♂) : régime carencé + 400 mg. de levure rouge sèche.

Les résultats obtenus, représentés par les courbes de la figure 3, montrent nettement que les levures rouges entières agissent comme source de provitamine A. Les différences que l'on observe à ce point de vue entre l'activité des levures et celle de l'amunine correspondent bien à la faible teneur des levures en carotène (10 γ par gr.) : en effet, les rats soumis au régime des levures ne reçoivent en fait, journellement, que 4 γ de carotène, apportés par les 400 mg. de levure, alors que les animaux dont le régime est complété par l'amunine ingèrent chaque jour 50 γ de carotène, apportés par les 0,05 cc. d'amunine, dose plus que suffisante pour obtenir l'effet maximum sur la croissance et l'état général. Ces différences quantitatives permettent déjà de prévoir que ni le torulène, ni le pigment acide, qui existent dans les levures rouges en quantités très supérieures à celle du carotène, ne peuvent se comporter en provitamine A.

Il était néanmoins utile de confirmer ces résultats en étudiant le comportement physiologique des différents pigments eux-mêmes, extraits des cellules.

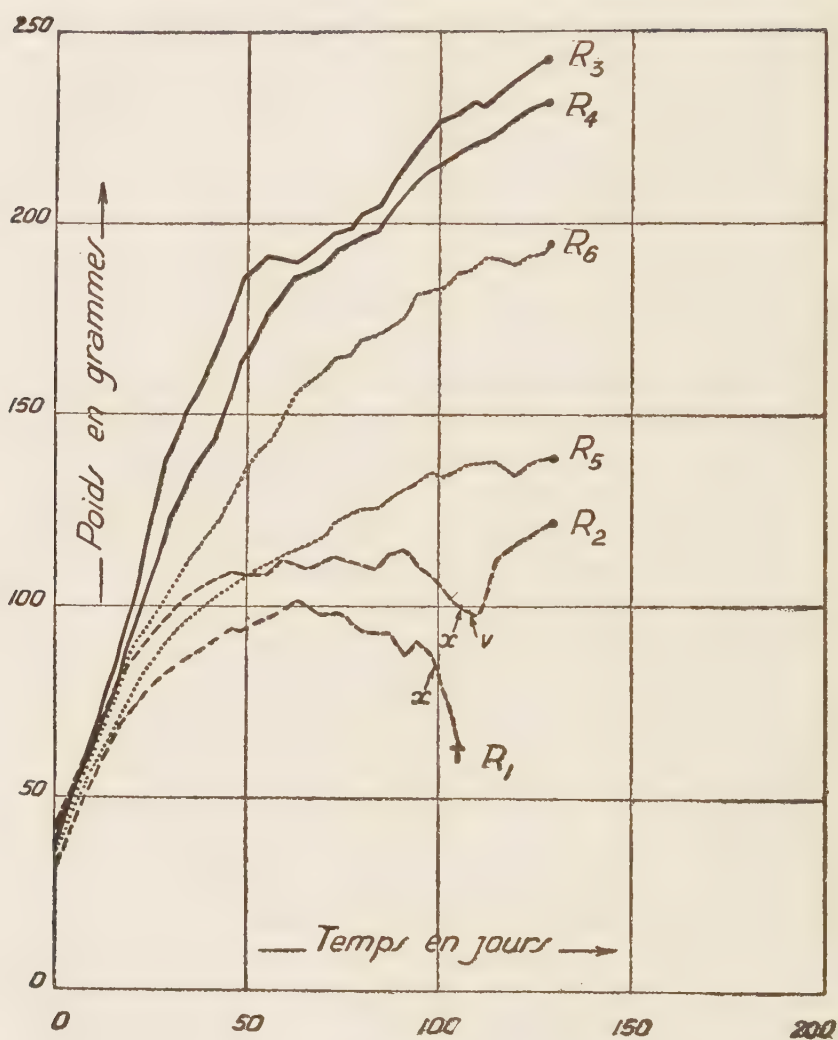


Fig. 3

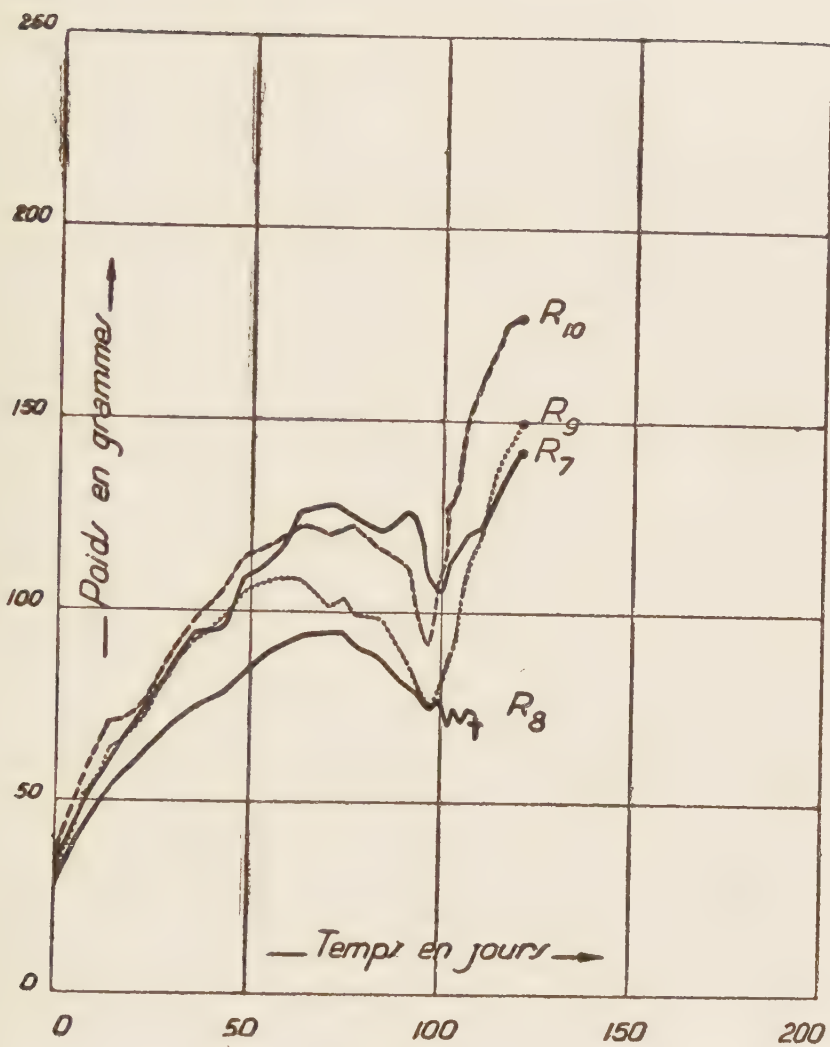


FIG. 4

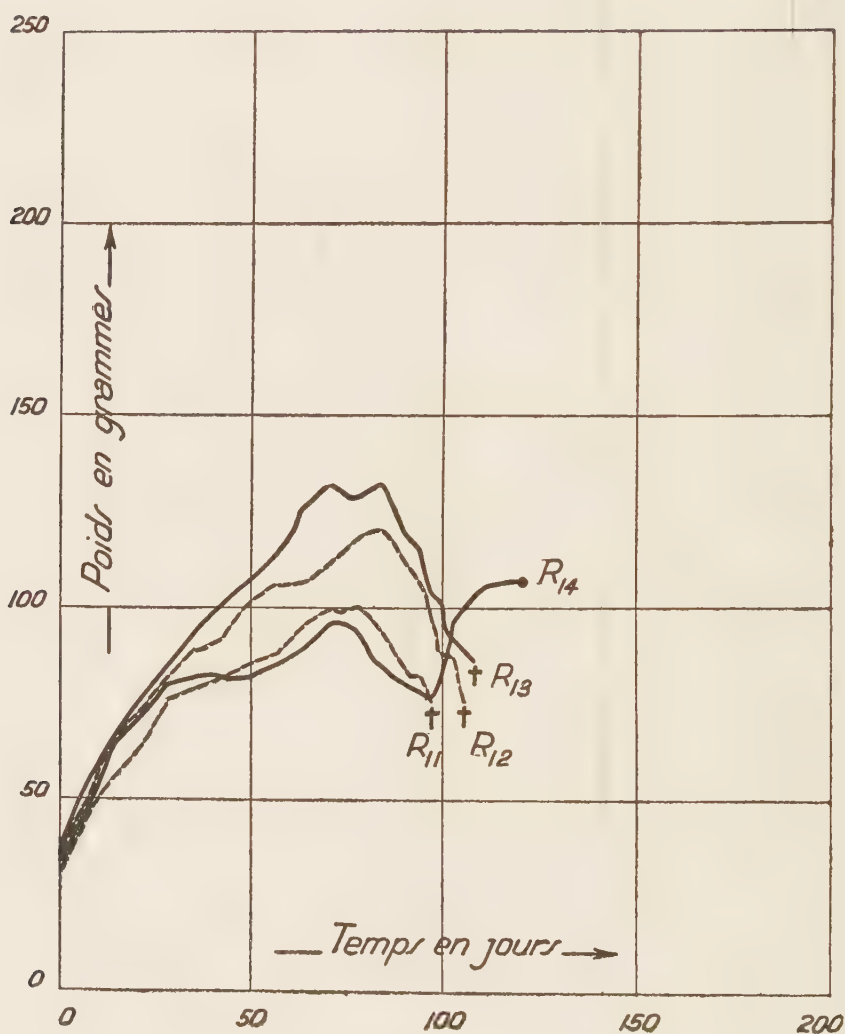


FIG. 5

C'est cette confirmation qu'apporte la deuxième série d'expériences suivante :

Les essais portent sur 8 rats dont les poids initiaux varient de 29 à 37 gr. Tous ces animaux sont soumis dès le début au régime carencé ; et ce n'est que lorsque la carence se manifeste nettement et que la xérophtalmie est bien déclarée, que leur sont administrées les différentes substances dont l'action éventuelle doit alors se révéler de façon curative. Les différents animaux reçoivent à ce moment des doses journalières correspondant à :

Rats 7 (♂) et 8 (♀) : 10 γ de β -carotène extrait des levures,

Rats 9 (♀) et 10 (♂) : 0,05 cc. d'amunine,

Rats 11 (♀) et 12 (♂) : 20 γ de torulène,

Rat 13 (♂) : 20 γ du pigment acide,

Rat 14 (♀) : 300 mg. de levure entière.

Les résultats obtenus sont donnés par les courbes des figures 4 et 5 ; ils mettent nettement en évidence le fait que seul le pigment identifié comme étant du β -carotène agit en provitamine A, le torulène et le pigment acide étant complètement inactifs à ce point de vue. *L'identification physiologique des différents pigments confirme ainsi pleinement leur identification physique.*

CHAPITRE III

RECHERCHES QUALITATIVES SUR LA SYNTHÈSE DES PIGMENTS CAROTENOÏDES PAR LES LEVURES ROUGES

On peut se demander si les différents pigments caroténoïdes dont l'étude a fait l'objet des précédents chapitres font partie des constituants cellulaires dont la proportion doit être constante, ou si, au contraire, cette proportion est sujette à des variations notables; c'est là une question importante : en effet, s'il est possible de faire varier à volonté la quantité des pigments contenus dans les cellules, le problème de leur synthèse devient alors accessible. Les expériences exposées dans le présent chapitre ont précisément pour but d'établir les possibilités d'obtenir, à volonté, des cellules de levures pigmentées ou non, et d'étudier en même temps quelques-unes des conditions nécessaires à la formation des pigments.

TECHNIQUE

Les expériences dont il s'agit ici sont des expériences qualitatives, dont la réalisation est faite de la manière suivante :

Les levures utilisées, riches en pigments, proviennent d'une culture sur eau de touraillons glucosée et gélosée ; elles sont en plein développement. On en prélève une toute petite quantité, que l'on dépose, à l'aide d'une spatule, à la surface d'un milieu de culture gélosé, et disposé dans des tubes à essais convenablement inclinés.

Le milieu de culture employé est constitué par :

1° Les sels minéraux ci-dessous (partie minérale de la solution de Reader) [24] :

$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	3 g.	$\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$	0,10 g.
$\text{SO}_4\text{Mg}, 7 \text{H}_2\text{O}$	0,7 g.	NaCl	0,5 g.
PO_4KH_2	1 g.	$(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$	0,4 g.

dans un litre d'eau distillée ;

2° Une ou des substances organiques définies introduites à la dose de chacune 1 % dans la solution précédente ;

3° De l'agar, utilisé à la dose de 2 % ; cet agar est préalablement lavé par macération pendant plusieurs jours dans de l'eau distillée fréquemment renouvelée.

Ce milieu, ajusté à $\text{pH}=6,0$, est réparti, encore chaud, dans des tubes à essai à raison de 5 cc. par tube ; après stérilisation, les tubes sont inclinés de telle sorte que le milieu, pris en masse après refroidissement, présente une surface suffisamment grande, favorable au développement des levures rouges, très avides d'oxygène. Lesensemencements et les diverses manipulations sont faits avec les précautions d'aseptie habituelles ; après l'ensemencement, les tubes, fer-

més par un tampon de coton recouvert d'une capsule de caoutchouc pour éviter toute évaporation, sont maintenus, sauf indications contraires, uniformément à 28°.

La formation des pigments s'observe très facilement par la coloration plus ou moins marquée que présentent les cellules au cours de leur développement.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. -- Influence de la nature de la source de carbone sur la formation des pigments

Une première série d'expériences a porté sur l'influence de la nature des molécules organiques introduites comme sources de carbone vis-à-vis de la croissance de *Rhodotorula Sanniei* et de la synthèse des pigments cellulaires. Les essais ont toujours été faits en double, dans certains cas en triple; ils ont toujours donné des résultats concordants. Ces résultats sont donnés dans le tableau IV :

Tableau IV

INFLUENCE DE LA NATURE DE L'ALIMENT CARBONÉ SUR
LA FORMATION DES PIGMENTS CAROTÉNOÏDES CHEZ
« RHODOTORULA SANNIEI ».

+++ = Croissance maxima réalisable dans les conditions expérimentales.

++ = Croissance moyenne.

+ = Croissance faible.

O = Croissance nulle.

A = Temps en jours écoulé depuis le moment de l'ensemencement jusqu'au moment où les levures acquièrent leur coloration maxima (rose franc ou rouge).

B = Temps en jours, pendant lequel cette coloration se maintient nettement.

C = Temps en jours, écoulé depuis le moment où la coloration maxima commence à décroître, jusqu'au moment où les cellules deviennent blanches.

R/2 = Culture restant plus de 20 jours en demi-teinte.

Tous les acides utilisés sont sous forme de sels neutres de sodium.

Les composés marqués d'une astérisque sont introduits stérilement après autoclavage de la solution minérale gélosée. Tous les autres font partie du milieu au moment de son autoclavage.

Source de carbone	Croissance	A	B	C
Sorbite	+++	3	4	R/2
Glucose	+++	3	3	1
Mannose	+++	3	10	R/2
Fructose	+++	3	5	7
Acide gluconique	+	—	—	—
Acide gluconique+glucose . .	+++	3	9	8
Alcool amylique*	0	—	—	—
Alcool amylique*+glucose . . .	+	—	—	—
Acide citrique	0	—	—	—
Acide citrique+glucose	+++	3	5	R/2
				puis → jaune
Alcool butylique*	0	—	—	—
Alcool butylique*+glucose . . .	0	—	—	—
Acide butyrique	+++	3	6	15
Acide butyrique+glucose . . .	0	—	—	—
Acide malique	+	—	—	—
Acide malique+glucose	++	3	5	14
Acide succinique	+	—	—	—
Acide succinique+glucose . . .	++	3	6	16
Acide maléique	+	—	—	—
Acide maléique+glucose	++	3	6	4
Erythrite	+	—	—	—

Source de carbone	Croissance	A	B	C
Erythrite+glucose	++	3	2	1
Acide lactique	+	—	—	—
Acide lactique+glucose	+++	3	20	R/2
Lactate d'éthyle	0	—	—	—
Lactate d'éthyle+glucose	0	—	—	—
Acide pyruvique	+	5	4	8
Acide pyruvique+glucose	++	3	2	2
Glycérine	+++	3	∞	—
Glycérine+glucose	+++	3	2	1
Acide glycérique	+	—	—	—
Acide glycérique+glucose	++	4	5	15
Triacétate de glycérine	0	—	—	—
Triacétate de glycérine+glucose	0	—	—	—
Alcool éthylique*	+++	4	5	1
Alcool éthylique*+glucose	+++	3	2	1
Glycol*	+	—	—	—
Glycol*+glucose	+	—	—	—
Acide glycolique	+	—	—	—
Acide glycolique+glucose	++	5	6	16
Acide acétique	++	4	4	2
Acide acétique+glucose	+	—	—	—
Isoprène*	0	—	—	—
Isoprène*+glucose	++	4	9	4
Alanine+glucose	++	3	15	3
Leucine+glucose	++	3	15	3

Les chiffres du tableau IV permettent les observations suivantes :

1° EN CE QUI CONCERNE LA CROISSANCE DES CELLULES :

Les différentes substances organiques introduites dans le milieu de culture peuvent se classer en plusieurs catégories, selon leur aptitude à être utilisées par les levures en question :

a) Substances permettant la croissance maxima dans les conditions expérimentales réalisées :

Glucose, mannose, fructose, sorbite, glycérine, alcool éthylique, acides butyrique et acétique.

b) Substances ne permettant qu'une croissance médiocre, ou ne permettant aucune croissance, mais sans effet toxique : ce sont celles qui, seules, sont incapables d'être utilisées comme sources de carbone, mais qui n'ont pas d'action inhibitrice vis-à-vis de la croissance des cellules, lorsque celles-ci ont, en même temps, du glucose à leur disposition :

Acides gluconique, citrique, malique, succinique, maléique, lactique, pyruvique, glycérique et glycolique, érythrite, isoprène.

c) Substances toxiques : ce sont celles qui, non seulement ne peuvent être utilisées comme sources de carbone, mais encore qui empêchent toute croissance en présence du glucose :

Alcools amylique et butyrique. lactate d'éthyle, triacétate de glycérine, glycol.

Le cas présenté par les acides butyrique et acétique est assez curieux : ces deux acides, employés sous forme de sels de Na, permettent une croissance soit bonne (acide butyrique), soit moyenne (acide acétique), lorsqu'ils sont *seuls* comme source de carbone utilisable dans le milieu ; mais l'un et l'autre se comportent en substances inhibitrices de la croissance, lorsque le milieu contient en même temps du glucose. Ce fait surprenant, dont l'explication n'apparaît pas jusqu'à présent, semble être bien établi par trois expériences successives.

Il convient de remarquer ici que le milieu de culture utilisé n'est pas ce que l'on peut appeler un *mi-*

lieu défini, au sens strict du mot : en effet, si les sels minéraux et les substances organiques utilisés ont été choisis parmi les plus purs qu'il soit possible de se procurer, l'agar, quelque bien lavé qu'il puisse être, est toujours susceptible d'apporter à l'état de traces des substances dont le rôle, dans la croissance des microorganismes, peut être fort important ; cette observation peut s'appliquer également à l'usage de coton pour boucher les tubes de culture, coton dont Lwoff [25] a constaté le rôle, précisément dans des cultures de levures rouges, voisines de celles dont il est question ici : le coton cardé brut contient en effet de la pyrimidine et du thiazol (Schopfer et Rytz jr.) [26]. Ces remarques prendront toute leur importance, lorsque dans le chapitre consacré aux recherches quantitatives sur la croissance et la pigmentation des cellules de *Rhodotorula Sanniei*, nous serons amené à constater l'impossibilité de faire pousser ces organismes dans un milieu liquide, strictement défini, en présence d'un substratum comme le glucose, sans que ce milieu soit additionné de vitamine B₁, ou, au moins, de pyrimidine.

2° EN CE QUI CONCERNE LA SYNTHÈSE DES PIGMENTS :

D'une façon générale, la pigmentation des cellules se fait suivant l'évolution suivante : après leur ensemencement, dès que les cellules sont en quantité suffisante pour former une culture visible à l'œil, elles apparaissent tout d'abord blanchâtres, elles se colorent ensuite peu à peu en rose, puis en rouge, leur

pigmentation atteignant ainsi son intensité maxima : la durée de cette évolution, donnée dans la colonne A, est toujours à peu près la même : dans les conditions réalisées ici, cette durée est de trois à cinq jours.

Cette coloration maxima se maintient sans changement apparent à l'œil pendant des temps qui sont, au contraire, extrêmement variables selon la nature des molécules organiques du milieu : ce sont ces temps qu'indique la colonne B. Enfin, dans la plupart des cas, la coloration s'atténue peu à peu, pour disparaître totalement au bout de temps également très variables selon les sources de carbone ; l'on obtient alors des cultures de *Rhodotorula Sanniei* tout à fait blanches.

Il apparaît alors que, parmi les substances organiques étudiées, les résultats du tableau IV permettent de distinguer celles dont l'utilisation par les levures est telle, que :

a) La pigmentation maxima ne se maintient qu'un temps court, et disparaît rapidement : acide acétique, alcool éthylique, glucose, mélanges glycérine+glucose, acide pyruvique+glucose, acide maléique+glucose, alcool éthylique+glucose, érythrite+glucose. Le comportement du glucose est, à ce point de vue, tout à fait caractéristique, et son usage permet d'obtenir facilement des cultures de *Rhodotorula Sanniei* tout à fait blanches.

b) La pigmentation maxima, une fois acquise, reste à peu près constante, sans décroître sensiblement ;

ce phénomène est surtout présenté par la glycérine et le mélange acide lactique+glucose.

c) La pigmentation évolue de façon intermédiaire entre les deux cas extrêmes précédents, soit que la pigmentation maxima se maintienne un temps court mais prenne un temps assez long pour disparaître : acide butyrique, mélanges acide malique+glucose et acide succinique+glucose ; soit que la pigmentation maxima se maintienne un temps assez long, mais disparaisse brusquement : mélanges alanine+glucose, leucine+glucose.

Cette classification fait ressortir la propriété du glucose d'agir ici, en quelque sorte, en inhibiteur de la synthèse des pigments : non seulement, en effet, le glucose apparaît comme incapable d'assurer aux cellules une pigmentation constante, mais encore il supprime rapidement la pigmentation des cellules lorsqu'il accompagne une substance qui assure à elle seule une synthèse continue de pigments : le phénomène se manifeste bien nettement quand on compare l'évolution des pigmentations de cultures de *Rhodotorula Sanniei* croissant en présence de glycérine seule, et du mélange glycérine+glucose.

D'autre part, il apparaît que certaines substances, comme l'acide citrique, qui seules, sont incapables d'être utilisées pour la croissance des levures en question, peuvent néanmoins jouer un rôle dans la synthèse des pigments : en mélange avec du glucose, elles prolongent en effet très notablement le temps pendant lequel les cellules restent pigmentées. En outre de l'acide citrique, c'est le cas des acides gly-

cérique, glycolique, malique, succinique, et surtout lactique.

Parmi tous ces résultats, il convient de retenir particulièrement ceux qui mettent en évidence l'aptitude de la glycérine à servir non seulement de source de carbone pour la croissance, mais surtout de matière première pour la synthèse des pigments. Ce fait est à rapprocher des observations de Ingraham et Steenbock [12] qui ont montré l'influence très favorable qu'exerçait la glycérine sur la synthèse des caroténoïdes par *Mycobacterium Phlei*.

Il convient enfin de faire les remarques suivantes :

1° L'évolution de la pigmentation, telle qu'elle vient d'être décrite, ne s'applique qu'aux milieux définis précédents; *Rhodotorula Sanniei* ensemencé sur milieu gélosé à base de saccharose et d'extrait de touraillons, se pigmente rapidement, et reste indéfiniment rouge, la pigmentation ayant même tendance à s'intensifier avec le temps.

2° L'évolution de la pigmentation dans les différents milieux définis précédents, est rigoureusement la même, que l'ensemencement des tubes soit fait avec des cellules provenant d'une culture fortement pigmentée (culture sur milieu gélosé à base de glycérine, ou sur milieu gélosé à base de saccharose et d'extrait de touraillons), ou d'une culture tout à fait blanche (culture sur milieu gélosé à base de glucose).

3° Malgré son insolubilité, l'isoprène, que l'on considère comme l'une des unités élémentaires constituant des carotènes, nous avait paru intéressant à

essayer : on pouvait espérer en effet que, finement dispersé dans le milieu par une agitation énergique, il pourrait être absorbé par les cellules et jouer un rôle dans la synthèse des pigments. En fait, l'expérience montre que l'évolution de la pigmentation de *Rhodotorula Sanniei* croissant en présence de glucose, n'est guère modifiée par la présence de l'isoprène.

II. -- Influence de la température sur l'évolution de la pigmentation

Il était intéressant d'étudier l'influence de la température sur l'évolution de la pigmentation au cours de la croissance ; cette étude est faite ici en fournissant aux cellules, soit du glucose, soit de la glycérine, soit l'un des mélanges acide lactique+glucose ou glucose+glycocolle, comme sources de carbone, les conditions, sauf la température, étant les mêmes que pour les expériences précédentes. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau V.

Tableau V

Source de carbone	Température	Croissance	A	B	C
Glucose	14°	+++	3	8	12
	17°	+++	3	6	5
	18°	+++	3	7	6
	20°	+++	3	5	3
	25°	+++	2	4	2
Glycérine	14°	+++	3	∞	—
	17°	+++	3	∞	—
	18°	+++	4	∞	—
	20°	+++	3	∞	—
	25°	+++	3	∞	—
Glucose + glycolle	14°	+++	3	∞	—
	17°	+++	2	∞	—
	18°	+++	2	∞	—
	20°	+++	2	∞	—
	25°	+++	2	∞	—
Glucose + lactate de Na	14°	+++	3	6	3
	17°	+++	2	6	2
	18°	+++	2	7	2
	20°	+++	2	6	2
	25°	+++	2	5	2

Ces résultats montrent que l'évolution de la pigmentation reste qualitativement la même, dans un intervalle de températures compris entre 14° et 28°. La seule différence, d'ordre quantitatif, est due à ce que l'augmentation de la température accélère sensiblement la vitesse d'évolution de la pigmentation, et notamment la décoloration du pigment, synthétisé au début du développement de la culture.

Là encore, la glycérine et le mélange acide lacti-

que+glucose se révèlent, par opposition au glucose seul, des matières premières de choix pour la synthèse des pigments.

III. -- Influence du pH sur l'évolution de la pigmentation

L'étude de l'influence du pH sur l'évolution de la pigmentation des cellules de *Rhodotorula Sanniei* au cours de leur croissance, est réalisée en utilisant des milieux analogues à celui employé jusqu'ici, mais dans lesquels les phosphates sont remplacés par des mélanges convenables de solutions de PO_4KH_2 M/15 et de $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ M/15; l'on a ainsi des milieux présentant toute la gamme de pH convenables. On prépare six séries de tubes de cultures dans chacune desquelles la source de carbone est constituée par l'une des substances ou des mélanges suivants : acide lactique, acide pyruvique, glucose, glycérine, acide lactique+glucose, acide pyruvique+glucose. Après ensemencement dans les conditions habituelles, ces tubes sont placés à l'étuve à 28°.

L'on n'observe aucune croissance dans les tubes renfermant l'acide lactique seul, quel que soit le pH du milieu ; les tubes contenant l'acide pyruvique seul, ne montrent qu'une très faible croissance de cellules qui restent d'ailleurs blanches. Les résultats obtenus avec les autres sources de carbone dans l'intervalle de pH 6,2 à pH 7,6 (tableau VI), indiquent que le pH du milieu n'a pratiquement aucune influence sur l'évolution de la pigmentation.

TABLEAU VI

INFLUENCE DU pH SUR L'ÉVOLUTION DE LA PIGMENTATION

Même légende que pour le tableau IV

Source de carbone	pH du milieu	Croissance	A	B	C
Glucose	5,2	++	3	4	1
	6,0	++	3	4	1
	6,4	++	3	4	1
	6,8	++	3	4	1
	7,2	++	3	4	1
	7,6	++	3	4	1
Acide lactique + glucose	5,2	+++	3	∞	—
	6,0	+++	3	∞	—
	6,4	+++	3	∞	—
	6,8	+++	3	∞	—
	7,0	+++	3	∞	—
	7,4	+++	3	∞	—
Acide pyruvique + glucose	5,5	+++	3	∞	—
	6,4	+++	3	∞	—
	6,8	+++	3	∞	—
	7,2	+++	3	∞	—
	7,6	+++	3	∞	—
	8,2	+++	3	∞	—
Glycérine	5,3	+++	3	∞	—
	6,2	+++	3	∞	—
	6,6	+++	3	∞	—
	7,0	+++	3	∞	—
	7,4	+++	3	∞	—
	8,0	+++	3	∞	—

CHAPITRE IV

RECHERCHES QUALITATIVES SUR LA SYNTHÈSE DES PIGMENTS CAROTENOÏDES PAR RHODOTORULA SANNIEI

La méthode suivie dans le chapitre précédent pour étudier la synthèse des caroténoïdes par *Rhodotorula Sanniei* en présence de diverses substances organiques, ne permettait que des observations qualitatives sur l'évolution de la pigmentation des cellules au cours de leur développement. Il était intéressant d'essayer de préciser les résultats de ces observations par des mesures aussi exactes que possible, permettant de suivre, en fonction du temps, à la fois les variations de poids de l'organisme en croissance, et celles de la quantité de pigments formés, cette dernière quantité pouvant être ainsi rapportée à l'unité de poids des levures, et ce, dans des conditions telles que les organismes en question réalisent leurs synthèses à partir de sources de carbone définies. Ce genre de recherches nécessite que l'on puisse, d'une part, obtenir une croissance suffisante de *Rhodotorula Sanniei* dans des milieux liquides, définis, parfaite-

ment limpides, et d'autre part, effectuer un dosage suffisamment précis des pigments synthétisés.

1° OBTENTION DES LEVURES EN MILIEUX LIQUIDES

L'obtention des levures en milieux liquides en quantités suffisantes, a présenté d'assez grandes difficultés: ces organismes ne peuvent en effet se développer convenablement que si l'aération du milieu est intense ; après plusieurs essais infructueux, dans lesquels ont été utilisés différents types de ballons de culture permettant une aération, nous nous sommes finalement servis du montage suivant, qui nous a donné toute satisfaction :

Des ballons en verre Pyrex, de 1 litre, à fond plat, à col court et à large goulot, sont munis d'un bouchon de caoutchouc percé de deux trous, dont l'un donne passage à un tube de verre portant à la partie inférieure une plaque de verre poreux (Schott, Iéna), de 30 mm. de diamètre ; cette plaque atteint presque le fond du récipient. Dans l'autre trou, un tube de verre, relié à une trompe à eau, permet l'aspiration d'air à travers le milieu liquide contenu dans le ballon. Des filtres de coton stérile empêchent la pollution du milieu par les poussières qui, autrement, seraient apportées par l'air aspiré. L'ensemble de l'appareil est évidemment stérilisé avant son usage.

Le milieu de culture est constitué par la même solution minérale qui a été utilisée précédemment, additionnée de la ou des substances organiques devant éventuellement servir au développement des levures

et à la synthèse de leurs pigments. La solution ainsi obtenue, ajustée à pH 6,0, est répartie à raison de 500 cc. dans chaque ballon. L'ensemencement se fait avec 1 cc. d'une suspension dans de l'eau distillée stérile, de cellules provenant de cultures obtenues, après 48 heures, à 28°, dans des tubes à essais, sur un milieu à base d'eau de touraillons gélosée et additionnée de 10 % de saccharose ; après ensemencement, les ballons sont reliés en série les uns aux autres, et le tout est placé à l'étuve à 28°. L'ensemble est alors mis en communication avec une trompe à eau et est ainsi traversé par un violent courant d'air. Au bout de temps convenablement choisis, on retire successivement les ballons : la récolte des cellules qu'ils contiennent est faite par centrifugation. Après lavage des levures par centrifugations successives, dans l'eau distillée stérile, ces organismes sont remis en suspension dans un volume d'eau défini ; de cette suspension, on prélève 1 cc., qui évaporé puis séché à 110° jusqu'à poids constant, permet de déterminer le poids exact des levures obtenues ; le reste de la suspension est utilisé pour l'extraction quantitative des pigments et leur dosage.

2° DOSAGE DES PIGMENTS SYNTHÉTISÉS PAR LES CELLULES

La suspension de levures, obtenue comme il vient d'être dit, est à nouveau centrifugée ; les levures sont recueillies quantitativement puis déshydratées par l'acétone ; les pigments qu'elles renferment sont alors

extraits par l'éther de pétrole, selon la technique indiquée précédemment ; puis sans effectuer de saponification, on fait évaporer l'éther de pétrole, et on reprend le résidu par un volume connu de CS_2 . On obtient ainsi la totalité des pigments contenus dans les cellules, sous forme d'une solution dans CS_2 , dont il s'agit maintenant d'exprimer la concentration. On a vu dans le chapitre I^{er} que, parmi les huit pigments dont l'existence a été mise en évidence chez *Rhodotorula Sanniei* cultivée sur eau de touraillons gélosée et sucrée, trois seulement existent dans les cellules en quantités appréciables. Ce sont les β -carotène, le torulène et le pigment acide, ce dernier étant de beaucoup le plus abondant. On peut donc, en première approximation, négliger quantitativement les autres pigments, et ne considérer que ces trois-là.

Sans chercher à les séparer, nous nous sommes bornés à les doser en bloc. Pour ce faire, nous avons admis que, dans tous les cas, les trois pigments principaux existent toujours, l'un par rapport à l'autre, dans les mêmes proportions (*). On a vu précédemment que, ramenées à 1 gr. de levures cultivées sur eau de touraillons gélosée sucrée, ces proportions étaient les suivantes :

β -carotène 10 γ ; torulène 143 γ ;
pigment acide 29.000 γ .

Connaissant d'autre part le coefficient d'absorption de chacun de ces pigments pour une longueur d'onde

(*) Ce n'est là qu'une hypothèse permettant de chiffrer les résultats obtenus ; mais, quelle que soit l'exactitude de cette hypothèse, ceux-ci restent toujours comparables entre eux.

donnée, il est possible de calculer le coefficient d'absorption de ce mélange dissous en quantité déterminée dans un volume donné de solvant (CS_2). Les mesures ont porté sur les trois longueurs d'ondes suivantes: 483, 522 et 535 $\text{m}\mu$, qui correspondent respectivement aux trois maxima des courbes d'absorption du β -carotène, du torulène et du pigment acide. Les mesures que l'on peut trouver dans la littérature concernant le β -carotène, ou celles que nous avons effectuées nous-même, concernant le torulène et le pigment acide libre, montrent que, pour chacune de ces longueurs d'ondes, les coefficients d'absorption sont les suivants :

λ ($\text{m}\mu$)	β -carotène	torulène	pigment acide
483	560	120	0,37
522	455	183	0,52
535	262	165	0,53

On peut calculer ainsi que pour $\lambda=483\text{m}\mu$, l'on a :

β -carotène : 10 γ /cc	$\log I_0/I = 5,6$
torulène : 143 γ /cc	$\log I_0/I = 17,2$
pigment acide : 29,000 γ /cc	$\log I_0/I = 10,7$

Soit pour le mélange : 29,15 mg/cc : $\log. \frac{I_0}{I} = 33,5$,
ce qui donne, pour ce mélange, une valeur de :
 $\kappa_m = 1,15$.

On trouve de même:

pour $\lambda = 522 \text{ m}\mu$ $\kappa_m = 1,57$;
 $\lambda = 535 \text{ m}\mu$ $\kappa_m = 1,43$.

Il est particulièrement intéressant d'exécuter les mesures à l'aide des trois longueurs d'ondes différentes, car la concordance des chiffres obtenus vient à l'appui de l'hypothèse de la constance, au moins approchée, des proportions des trois pigments envisagés.

3° RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

a) *Source de carbone constituée par la glycérine seule.*

Le milieu de culture consiste ici en la solution minérale additionnée de 5 % de glycérine pure, préalablement redistillée dans le vide. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau VII :

Tableau VII

EVOLUTION DE LA CROISSANCE ET DE LA PIGMENTATION DE RHODOTORULA SANNIEI EN PRÉSENCE DE GLYCÉRINE SEULE.

T = temps en jours.

L = poids des levures en gr., obtenues dans 500 cc. du milieu de culture.

v = volume, en cc., du CS₂ dans lequel est dissous l'ensemble des pigments.

d = épaisseur, en cm., de la cuve utilisée pour les mesures spectrophotométriques.

$\phi = \log \frac{I_0}{I}$

p = poids des pigments extraits des cellules, en mg. par gr. de levures. Ce poids est calculé d'après la formule :

$$p = \frac{2,3 \phi \cdot v}{\chi^m \cdot d}$$

T	L	v	d		λ			p. moyen	
					483	522	535		
3	0,110	10	10	}	δ	1,07	1,40	1,38	19,4
					p	19,5	18,6	20,2	
6	0,220	10	4	}	δ	1,47	1,97	1,94	33,9
					p	33,4	32,7	35,5	
9	0,375	—	—			—	—	—	—
12	0,321	10	2,5	}	δ	1,39	1,73	1,77	34,0
					p	34,6	32,1	35,4	
18	0,291	9	2,5	}	δ	1,52	1,67	1,50	32,4
					p	37,3	30,2	29,9	

Ces résultats confirment pleinement les observations qualitatives du chapitre précédent: la glycérine seule, comme source de carbone définie, apparaît particulièrement favorable non seulement à la croissance des levures, mais aussi à la synthèse de leurs pigments.

b) *Source de carbone constituée par le mélange glycérine+glucose.*

Le milieu de culture consiste en la solution minérale, additionnée de 5 % de glucose et de 5 % de glycérine. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau VIII.

Tableau VIII

EVOLUTION DE LA CROISSANCE ET DE LA PIGMENTATION DE
RHODOTORULA SANNIEI EN PRÉSENCE DU MÉLANGE
GLYCÉRINE+GLUCOSE.

(mêmes légendes que pour le tableau VII)

T	L	v	d			λ			p. moyen
						483	522	535	
3	0,224	8	4	{	δ	1,45	1,84	1,77	25,1
					p	25,9	24	25,5	
4	0,220	10	3	{	δ	1,41	1,76	1,65	40,6
					p	42,7	39	40,2	
5	0,300	10	3	{	δ	1,09	1,29	1,23	22,7
					p	24,2	20,9	22	
6	0,260	10	3	{	δ	0,91	1,11	1,065	22,0
					p	23,25	20,75	21,9	
15	0,247	10	10	{	δ	0,77	0,85	0,89	5,7
					p	6,2	5,02	5,8	

Ces résultats confirment pleinement les observations faites précédemment sur le comportement des levures en milieu gélosé, en présence du milieu glycérine+glucose : la chute de la quantité de pigments (il n'y en a plus que 5,7 mgr. par gr. de levures après 15 jours) correspond tout à fait à la décoloration observée dans les cultures sur gélose. Ces résultats montrent ainsi que si le mélange glycérine+glucose constitue une source de carbone utilisable pour la

croissance de *Rhodotorula Sanniei*, ce mélange ne permet pas à ces organismes de maintenir leur pigmentation : le rôle inhibiteur du glucose ajouté à la glycérine est très net.

c) *Source de carbone constituée par du glucose seul.*

Au cours d'essais préliminaires, nous avons constaté que, contrairement à ce que l'on obtient dans les milieux renfermant, soit de la glycérine seule, soit le mélange glycérine+glucose, le développement de *Rhodotorula Sanniei* dans un milieu constitué par la solution minérale additionnée de 5 % de glucose reste très faible ; après 10 jours, le poids des levures ne dépasse pas 0,12 gr., avec une teneur en pigment de 13,4 mgr. par gr. de levure sèche. Il était alors intéressant de voir, si, comme dans le cas de *Torula Rubra* étudié par Schöpfer [27], l'addition de vitamine B₁ à un tel milieu, serait suffisante pour assurer la croissance de *Rhodotorula Sanniei*. L'expérience est faite en introduisant 120 γ de vitamine B₁ (*) dans 500 cc. de la solution minérale additionnée de 2 % de glucose. Les résultats indiqués dans le tableau IX sont très nets : le milieu ainsi obtenu devient tout à fait apte non seulement à assurer la croissance des cellules, mais aussi la constance de leur pigmentation ; cette constance de la coloration des cellules au cours de leur développement souligne une différence importante entre les comportements

(*) Nous sommes heureux de remercier ici M. le Docteur KARL, des Etablissements Hofmann-Laroche, qui a bien voulu nous envoyer la vitamine B₁ pure, utilisée ici.

de *Rhodotorula Sanniei* dans le milieu actuel, et dans le milieu contenant le mélange glucose - glycérine.

Tableau IX

(Même légende que pour le tableau VII)

INFLUENCE DE L'ANEURINE SUR LA CROISSANCE ET LA
PIGMENTATION DE RHODOTORULA SANNIEI

T	L	v	d			λ			p. moyen
						483	522	535	
4	1,32	10	0,5	{	δ	0,785	1,03	1,0	23,0
					p	23,7	22,0	24,4	
6	1,08	10	0,5	{	δ	0,665	0,965	0,880	25,0
					p	24,6	26,0	26,2	
9	0,87	10	1	{	δ	0,97	1,25	1,165	18,8
					p	19,4	18,3	18,8	
13	1,17	10	1	{	δ	1,22	1,49	1,39	19,5
					p	20,8	18,6	19,2	
16	1,08	10	1	{	δ	1,21	1,39	1,28	20,1
					p	22,4	18,9	19,1	
22	1,11	10	1	{	δ	1,46	1,82	1,68	24,9
					p	26,3	23,9	24,4	

Il convient de faire les remarques suivantes:

1° La comparaison des résultats obtenus avec les deux milieux dont l'un contient du glucose seul, et l'autre de la glycérine seule, comme sources de car-

bone, fait ressortir que le milieu défini à base de glucose est peu capable d'assurer la croissance de *Rhodotorula Sanniei* en l'absence de vitamine B₁, alors que la glycérine semble pouvoir être assez bien utilisée à elle seule comme source de carbone, sans l'adjonction d'aucun facteur de croissance. On peut se demander alors si la glycérine peut être réellement utilisée par les organismes en question, en l'absence de vitamine B₁ (ou de sa moitié pyrimidine), ou bien si la glycérine employée dans les expériences actuelles ne contient pas, même après distillation sous vide, des traces de pyrimidine par exemple, qui, entraînées par les vapeurs de glycérine, continueraient à accompagner cette dernière substance malgré les traitements de purification que l'on a pu lui faire subir. Il est très difficile, pour ne pas dire impossible, de décider entre ces deux possibilités : les comportements si différents des levures en présence de glucose+glycérine et de glucose+vitamine B₁, conduisent néanmoins à admettre que la glycérine ne contient aucun corps agissant en vitamine B₁, et que, par conséquent, la glycérine seule est utilisée à la fois pour la croissance et la synthèse des pigments de *Rhodotorula Sanniei*.

2° Les recherches de Schöpfer [27] sur les besoins de *Rhodotorula Rubra* et *Rhodotorula Flava* en vitamine B₁ ont montré que ces organismes sont capables de synthétiser la moitié « thiazol » de l'aneurine, et qu'il suffit de leur fournir la moitié « pyrimidine » pour assurer leur développement en milieu synthétique. Il était utile de se rendre compte

ici du comportement de *Rhodotorula Sanniei* à cet égard. L'expérience est faite de la façon suivante (*): on prépare trois séries de ballons dans chacun desquels on introduit 500 cc. de la solution minérale additionnée de 2 % de glucose; les ballons de la série I reçoivent en outre 0,5 cc. d'une solution diluée de thiazol (4-méthyl-5- β -oxyéthyl-thiazol), les ballons de la série II 0,5 cc. d'une solution diluée de pyrimidine (2-méthyl-4-amino-5-oxyméthyl-pyrimidine), et les ballons de la série III 0,5 cc. de la solution de thiazol et 0,5 cc. de la solution de pyrimidine. La stérilité de ces différents milieux est obtenue en traitant d'abord la solution minérale glucosée seule, à 120°, pendant 1/2 heure; puis après y avoir ajouté les solutions stériles de vitamine B₁ ou de ses constituants à l'aide d'une pipette stérile, en recommençant la stérilisation de l'ensemble à 115° pendant 15 minutes. On considère que la destruction thermique de la vitamine B₁, ou de ses constituants, est négligeable dans ces conditions.

Après ensemencement, l'ensemble des ballons est maintenu, dans les conditions décrites précédemment (forte aération!) à l'étuve à 28°.

Au bout de 10 jours, il n'y a encore pratiquement aucune croissance dans les solutions glucosées additionnées du thiazol seul; en revanche, *Rhodotorula Sanniei* croît fort bien dans les ballons des séries II et III, comme le montrent les chiffres du tableau X.

(*) Nous sommes heureux de remercier ici M. A. LWOFF auquel nous sommes redevables des solutions de thiazol et de pyrimidine.

Tableau X
(Même légende que pour le tableau VII)

INFLUENCE DES CONSTITUANTS DE L'ANEURINE SUR LA
CROISSANCE ET LA PIGMENTATION DE *RHODOTORULA*
SANNIEL.

Série	T	L	v	d		λ			p. moyen
						483	522	535	
II	3	0,63	5	1	δ	0,77	0,92	0,88	11,4
					p	12,4	10,65	11,2	
III	3	0,60	5	1	δ	0,445	0,58	0,545	7,3
					p	7,6	7,1	7,3	
II	9	1,32	10	0,5	δ	1,09	1,45	1,38	32,9
					p	33,04	32,03	33,6	
III	9	1,23	10	1	δ	1,25	1,56	1,495	19,3
					p	20,3	18,05	19,58	

Il apparaît ainsi que la moitié pyrimidine de l'aneurine joue le même rôle que la molécule entière, aussi bien vis-à-vis de la pigmentation que vis-à-vis de la croissance de *Rhodotorula Sanniel*. Ces résultats viennent ainsi confirmer ceux que Schöpfer a obtenus avec d'autres espèces de *Rhodotorula*.

RESUME

1° L'étude des pigments caroténoïdes contenus dans les cellules de *Rhodotorula Sanniei* cultivées sur eau de touraillons gélosée, additionnée de 10 % de saccharose, a permis de mettre en évidence l'existence de huit pigments différents : sept pigments à caractère de carbures d'hydrogène, et un pigment à caractère acide. Parmi les sept pigments neutres, quatre d'entre eux ont pu être identifiés : ce sont le β -carotène, le γ -carotène, le torulène et le lycopène. Le pigment acide ne semble pas pouvoir être ramené à un pigment de constitution connue.

2° Des mesures quantitatives montrent que dans les mêmes levures, la proportion des pigments les plus abondants correspond, pour un gr. de levure séchée à 110°, à :

β -carotène 10 γ ; torulène 143 γ ;
pigment acide 29.000 γ .

Le pigment acide est ainsi, de beaucoup, le plus important quantitativement.

3° Ces mesures ont impliqué l'établissement des spectres quantitatifs d'absorption du torulène et du pigment acide en solution dans le sulfure de carbone ; ces spectres sont donnés par les figures 1 et 2.

4° L'identification physique des différents pigments a été confirmée par leurs propriétés physiologiques :

le pigment identifié comme étant le β -carotène se comporte en provitamine A, alors que ni le torulène ni le pigment acide ne sont actifs à cet égard.

5° L'étude qualitative des conditions de synthèse des pigments montre que, sur milieu gélosé, la glycérine constitue un aliment de choix pour *Rhodotorula Sanniei*, aussi bien en ce qui concerne la croissance des cellules que leur pigmentation ; le glucose permet une croissance convenable, mais sans assurer la continuité de la pigmentation des cellules ; l'utilisation d'un milieu gélosé glucosé permet ainsi facilement d'obtenir *Rhodotorula Sanniei* sous forme de cellules parfaitement blanches.

6° L'étude quantitative de l'influence de la composition du milieu de culture vis-à-vis de l'évolution de la pigmentation, confirme l'aptitude de la glycérine à assurer à la fois croissance et pigmentation ; en ce qui concerne le rôle du glucose, celui-ci ne permet la croissance de *Rhodotorula Sanniei* qu'en présence de vitamine B₁ ou de son constituant pyrimidique, ce qui est tout à fait en accord avec les résultats obtenus précédemment par Schöpfer sur des espèces de levures voisines. Le fait que le glucose se comporte de façon différente s'il est en présence de glycérine ou de vitamine B₁, conduit à penser que la glycérine ne contient pas d'aneurine, et, peut, par conséquent, être utilisée par *Rhodotorula Sanniei*, en milieu synthétique, sans l'adjonction de ce facteur de croissance.

BIBLIOGRAPHIE

1. E. LEDERER. — Les caroténoïdes des plantes. Paris, Hermann ; 1934.
2. E. LEDERER. — Les caroténoïdes des animaux. Paris, Hermann ; 1935.
3. L. ZECHMEISTER. — Carotinoïde, Berlin, J. Springer ; 1934.
4. W. ZOFF. — *Botanische Zeitung*, **47**, 85 ; 1889.
5. W. ZOFF. — *Zs. wis. Mikros. u. mikros. Tech.*, **6**, 172 ; 1889.
6. W. ZOFF. — *Ber. deut. bot. Gesell.*, **9**, 22 ; 1891.
7. W. ZOFF. — *Zs. Physiol. und Morphologie niederer Organismen*, **1**, 30 ; **2**, 3 ; 1892 ; **3**, 26 ; 60 ; 1893.
8. F. B. GURD et W. DENIS. — *J. exp. Med.*, **14**, 606 ; 1911.
9. V. READER. — *Biochem. J.*, **19**, 1049 ; 1925.
10. E. CHARGAFF. — *Centblt. Bakt. (I)*, **119**, 121 ; 1930.
11. M. A. INGRAHAM et C. A. BAUMANN. — *J. Bact.*, **28**, 31 ; 1934.
12. M. A. INGRAHAM et H. STEENBOCK. — *Biochem. J.*, **29**, 2553 ; 1935.
13. A. CHAPMAN. — *Biochem. J.*, **10**, 548 ; 1916.
14. E. LEDERER. — *C. R. Acad. Scienc.*, **197**, 1694 ; 1933.
15. P. KARRER, L. LÖWE et H. HÜBNER. — *Helvetica Chem. Acta*, **18**, 96 ; 1935.
16. R. KUHN et E. LEDERER. — *Ber.*, **66**, 488 ; 1933.
17. J. LODDER. — Die Anaskosporogenen Hefen, Amsterdam, N. V. Noord-Hollandsche Uitgeversmaatschappij ; 1934.
18. R. KUHN et H. BROCKMANN. — *Zs. physiol. Chem.*, **206**, 41 ; 1932.

19. M. TSWETT. — *Ber. deutsch. bot. Gesell.*, **24**, 384 ; 1906.
20. R. KUHN et H. BROCKMANN. — *Ber.*, **66**, 4071 ; 1931.
21. L. ZECHMEISTER et L. v. CHOLNOKY. — *Die Chromatographische Adsorptionsmethode*. Wien, J. Springer, 1937.
22. H. SIMONET. — *Bul. Soc. Chim. biol.*, **5**, 539 ; 1923.
23. T. B. OSBORNE et L. B. MENDEL. — *J. Biol. Chem.*, **37**, 557 ; 1919.
24. V. READER. — *Biochem. J.*, **21**, 904 ; 1927.
25. A. LWOFF. — *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 53 ; 1938.
26. W. H. SCHÖPFER et RYTZ jr. — *Arch. f. Mikrobiol.*, **8**, 244 ; 1937.
27. W. H. SCHÖPFER. — *C. R.*, **205**, 445 ; 1937.

DEUXIÈME THESE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

1° - Métabolisme du nerf.

2° - Assimilation du carbone minéral chez
les microorganismes.

Lu et accepté:

LES MEMBRES DU JURY,

CARDOT.

DOUIN.

FROMAGEOT.

Vu et approuvé :

LE DOYEN DE LA FACULTÉ

DES SCIENCES DE LYON,

LONGCHAMBON.

Vu et permis d'imprimer

LYON, le 2 Juin 1938.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,

A. LIRONDELLE.



BOSC FRÈRES, M. & L. RIOU

°° °° °° IMPRIMEURS-ÉDITEURS °° °° °°

°° **42, QUAI GAILLETON, 42** °°

°° °° °° °° **LYON** °° °° °° °°



